

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 21 SEP 1999

WIPO PCT

DN 99/458

£JWU

Kongeriget Danmark

Patent application No.: PA 1998 01102

Date of filing: 02 SEPT. 1998

Applicant: Søren Gregersen
c/o Hans Harding Aps
Gustav Holms Vej 12
DK-9210 Aalborg SØ

This is to certify the correctness of the following information:

The attached photocopy is a true copy of the following document:

- The specification and drawings as filed with the application on the filing date indicated above.



Erhvervsministeriet
Patentdirektoratet



TAASTRUP 16 SEPT. 1999

Karin Schlichting
Head Clerk

Modtaget PD
- 2 SEP. 1998

01. september 1998

Søren Gregersen
c/o
Hans Harding ApS
Gustav Holms Vej 12
9210 Aalborg SØ

Vision baseret isolation af Langerhanske øer

Titel : Visions-baseret isolation af Langerhanske øer: med mulighed for computerkontrol, dokumentation og automatisering.

Opfinder: Søren Gregersen (cpr. 290565-xxxx), adjunkt, læge, Ph.D.

Privat: Solbærhaven 122, 8520 Lystrup. Tlf. 86224245 / 20935063.

Arbejde: Medicinsk-Endokrinologisk Afd. C, Århus Universitetshospital, Tage-Hansensgade 2, 8000 Århus C. Tlf. 89497735.

Baggrund.

Diabetes (sukkersyge) er karakteriseret ved en defekt i de insulin-producerende β -celler i bugspytkirtlen (pankreas). β -cellerne er arrangeret i de såkaldte Langerhanske øer i det exokrine væv. β -cellernes evne til at respondere differentieret på blodglukosekoncentration er essentiel for opretholdelsen af en normal metabolisme i kroppen. Tilgængeligheden af isolerede øer fra dyr og mennesker spiller en stor rolle i forbindelse med 1. udforskningen af fysiologiske og patofysiologiske mekanismer i den endokrine pankreas samt 2. til transplantation både dyrekseperimentelt og humant. Transplantation af Langerhanske øer indebærer en potentiel behandling af diabetes. Desuden er der et stort behov for isolerede øer til screening og afprøvning af insulinotrope, nye potentielle antidiabetika. Behovet for automatiserede metoder til hurtig og sikker "large-scale" isolation af øer er således stort.

Nuværende metoder:

De nuværende teknikker til isolation af Langerhanske øer indebærer oftest injektion af kollagenase i pankreas' gangsystem. Pankreas disintegreres herved og efter skylning af vævet kan øerne isoleres. Øerne kan herefter isoleres på flere måder f.eks. manuel "plukning" under et stereomikroskop; øerne suges op i en speciel glaspipette eller de overføres til en "ske". Begge metoder kræver idendifikation ved synets hjælp. Mange laboratorier verden over anvender manuel isolation fordi denne metode er mest skånsom for øerne.

Indenfor de senere år er beskrevet metoder til oprensning af øer på gradienter (Ficoll/Percoll) som med fordel anvendes på f.eks. føtale rotteøer. En række andre metoder er beskrevet i litteraturen. Til isolation af øer fra *hunde, grise eller mennesker* anvendes oftest gradient centrifugering. De nuværende metoder har en række *ulempes*, kort beskrevet er disse: 1. manuel ø-isolation er yderst tidskrævende, 2. der er inter-operator variation, 3. der sikres ikke hurtig overførsel af øerne til næringsmedium, 4. øerne kan tage skade af centrifugering og osmotiske gradienter.

MÅLET MED OPFINDELSEN.

At fremstille et apparatur til automatisk isolation af Langerhanske øer der samtidig muliggør at man kan beskrive øernes fysiske karakteristika og selektere (f.eks. p.b.a. størrelse og form).

KONCEPT.

Apparaturet skal v.h.j.a. digitaliseret billedbehandling (*Digital Imaging, Image Analysis*) lokalisere de Langerhanske øer i vævssuspensionen og isolere disse. Digital imaging åbner endvidere mulighed for at beskrive øernes fysiske data samt at ø-isolations processen automatiseres.

Fordele ved Digital Imaging-assisteret ø-isolation.

En række krav opstilles for at sikre øernes fysiske og funktionelle integritet optimalt sammenlignet med gængse metoder til ø-isolation: 1. øerne må ikke skades på nogen måde, hverken fysisk eller kemisk, 2. øerne skal, i enhver henseende, opføre sig som øer isoleret v.h.j.a. traditionelle metoder (hvad angår udseende, sekretionsmønster m.m). 3. apparaturet skal være istand til at genkende og isolere øerne uden brug af farve- eller anti-stoffer, 4. apparaturet kan arbejde ved 4°C og 5. risiko for kontamination mindskes idet pipetter, slanger m.m. kan autoklaveres eller er engangsmateriale.

Løsningsmodel I og II.

Begge løsningsmodeller er baseret på fotodetektion af øerne (digital imaging). Afhængig af løsningsmodel (I og/eller II) isoleres øerne ved hjælp af:

- I.** Detektion og separation af øerne i et tyndt glastrør (eller kanal).
- II.** Opsugning af øer med pipette der bevæges rundt i en petrisskål (eller anden plan flade indeholdende vævssuspensionen) ved computer-styrede bevægelser.

"Claims" omfatter:

Identifikation (visuel og/eller digitaliseret) af nedennævnte biologiske materiale* i

- I.** (Løsningsmodel I): Et hårrør, eller i en kanal, udført i gennemsigtigt (klart) materiale med en indre diameter der er lidt større end de største øer eller celleclusters.
- II** (Løsningsmodel II): En petrisskål, eller anden vædskefyldt plan flade indeholdende vævssuspensionen.

Med "metoden" menes nedenfor enten løsningsmodel I eller II.

***Angående det biologiske materiale der omfattes:**

- 1. Dækker anvendelse af metoden til isolation af Langerhanske øer fra ethvert species, inklusive mennesker. De Langerhanske øer kan være omgivet af ethvert tænkeligt materiale, biologisk eller ikke-biologisk (f.eks. til hindring af immun-reaktion i forbindelse med transplantation). Øerne/celleclusters* kan være mærkede med antistof eller anden substans tilsat i identifikations og/eller analyse-øjemed.
- 2. Dækker anvendelse af metoden til beskrivelse af fysiske/kemiske/biokemiske karakteristika ved de Langerhanske øer.
- 3. Dækker anvendelse af metoden til isolation eller beskrivelse af fysiske/kemiske/biokemiske karakteristika ved det exokrine væv.

4. Dækker anvendelse af metoden til isolation eller beskrivelse af fysiske/kemiske/biokemiske karakteristika ved andre celleclusters end Langerhanske øer.
5. Dækker anvendelse af metode til enhver efterfølgende oprensningsprocedure eller udvælgelse af øer end nævnt under pkt. 1. D.v.s. at den dækker også en eventuel anvendelse af metoden til isolation eller udvælgelse af øer der primært (d.v.s. første isolations procedure efter udtagelsen af pankreas) kan være isoleret ved anden metode.

Ad cellecluster⁺

Med cellecluster menes naturlige eller kunstigt opståede cellehobe på 3-100.000 celler fra ethvert hvirveldyr og/eller ex-corpori opståede cellehobe, f.eks. cancer celler. Celleclusters opstår i cellelinier. Genteknologisk modificerede øer eller celleclusters er ligeledes omfattet. Cellehobe bestående af oprindeligt encellede organismer er ligeledes omfattet.

Antistof-, eller på anden måde, konjugerede celler resulterende i cellehobe er ligeledes omfattet.

TEKNISK BESKRIVELSE AF OPFINDELSEN.

Visions-baseret identifikation af, og efterfølgende, isolation af Langerhanske øer. Specifikt foregår identifikationen i enten:

I. Et hårrør, eller kanal, udført i gennemsigtigt (klart) materiale der for ø-isolationens vedkommende har en indre diameter på mellem 0.25-3 μm og en længde på ca. 5-35 mm. For andre celleclusters lidt større end diameteren på de største clusters. Den indre form af røret eller kanalen kan have enhver tænkelig geometrisk form i tværsnit f.eks. rund eller kvadratisk og i længden f.eks. konisk.

II. En petrisskål, eller anden plan flade indeholdende vævsuspensionen.

Den visuelle identifikation kan foregå ved alle bølgelængder og for det tilfælde at der til vævet er sat antistof eller andre substanser til øerne/celleclusters m.h.p. identifikation og /eller analyse kan der være tale om at sende lys af én bølgelængde ind på vævet og lade kameraet detektere lys af

anden bølgelængde. Der kan være tale om at indsætte filtre på lyskilden og eller kameraet.

Løsningsmodel I (se figur I).

Princippet i denne model er at et kamera med zoom-udstyr (A) scanner et hårrør eller kanal (C). Kameraet er tilkoblet en computer med program til digital image analysis (B). Hårrøret eller kanalen er via en tynd slange (E) forbundet til et reservoir (F) hvori vævssuspensionen befinder sig. Dette reservoir er i konstant, langsom rotation (ca. 10 omdr/min) v.h.j.a. kontrolleret el-motor (G) for at holde vævet i homogen suspension.

Ved enten at applicere et tryk på reservoir'et eller ved tyngdekraftens hjælp tillades vævssuspensionen at passere igennem hårrøret eller kanalen (C) med en nøje afstemt hastighed således at identifikationen i hårrøret lader sig gøre. Idet flowhastigheden kan beregnes ud fra partikelbevægelsen i hårrøret beregnes den tid der skal gå før mikropumpen (H) aktiveres. Mikropumpen leverer en kortvarig væskestrøm (vinkelret, eller næsten vinkelret, på hårrøret), der medfører at øen/celleclusteren ændrer retning og bevæger sig ud i et siderør (I) som via en slange ender i en flaske (J) med dyrkningsmedium. Øerne kan også overføres direkte til andre medier (f.eks. til inkubationsvials i forbindelse med forsøg og/eller analysearbejde).

Eventuelt erstattes mikropumpen (H) af en elektromagnetisk styret ventil, som sørger for at "guide" øen ud i siderøret (I).

Røret eller kanalen hvori identifikationen foregår belyses af en lyskilde (ikke vist på figur I). Se kommentar side 4 nederst.

Løsningsmodel II (se figur II).

Et kamera (A) tilkoblet en computer med program til digital image analysis (B) scanner en petrisskål (C) eller anden plan flade indeholdende vævssuspensionen. Kamera og pipette (D) (som evt. er bygget sammen til samme enhed) styres i x-y-z planet med computer-styrede el-motorer (E). Pipettens spids er synlig i kameraets billedudsnit. Pipetten er tilkoblet en plastik-slange (F) som ender i en flaske (G) med medium hvortil øerne/celleclusters overføres. Øerne/celleclusteres kan også overføres direkte til andre medier (f.eks. til inkubationsvials i forbindelse med forsøg og/eller analysearbejde). I flasken (G) er der via sug (H) et lille undertryk, som gør, at øerne suges

Søren Gregersen.

Fortroligt materiale.

30.8.1998.

igennem pipette og slange. På slangen (F) placeres en computer-kontrolleret ventil (I), som styrer suget i pipetten (D).

Z-y-x styringen (E) foregår med en tilstrækkelig nøjagtighed til med sikkerhed at kunne opsuge én \emptyset (d.v.s. en nøjagtighed i alle planer på omkring 0.05 mm).

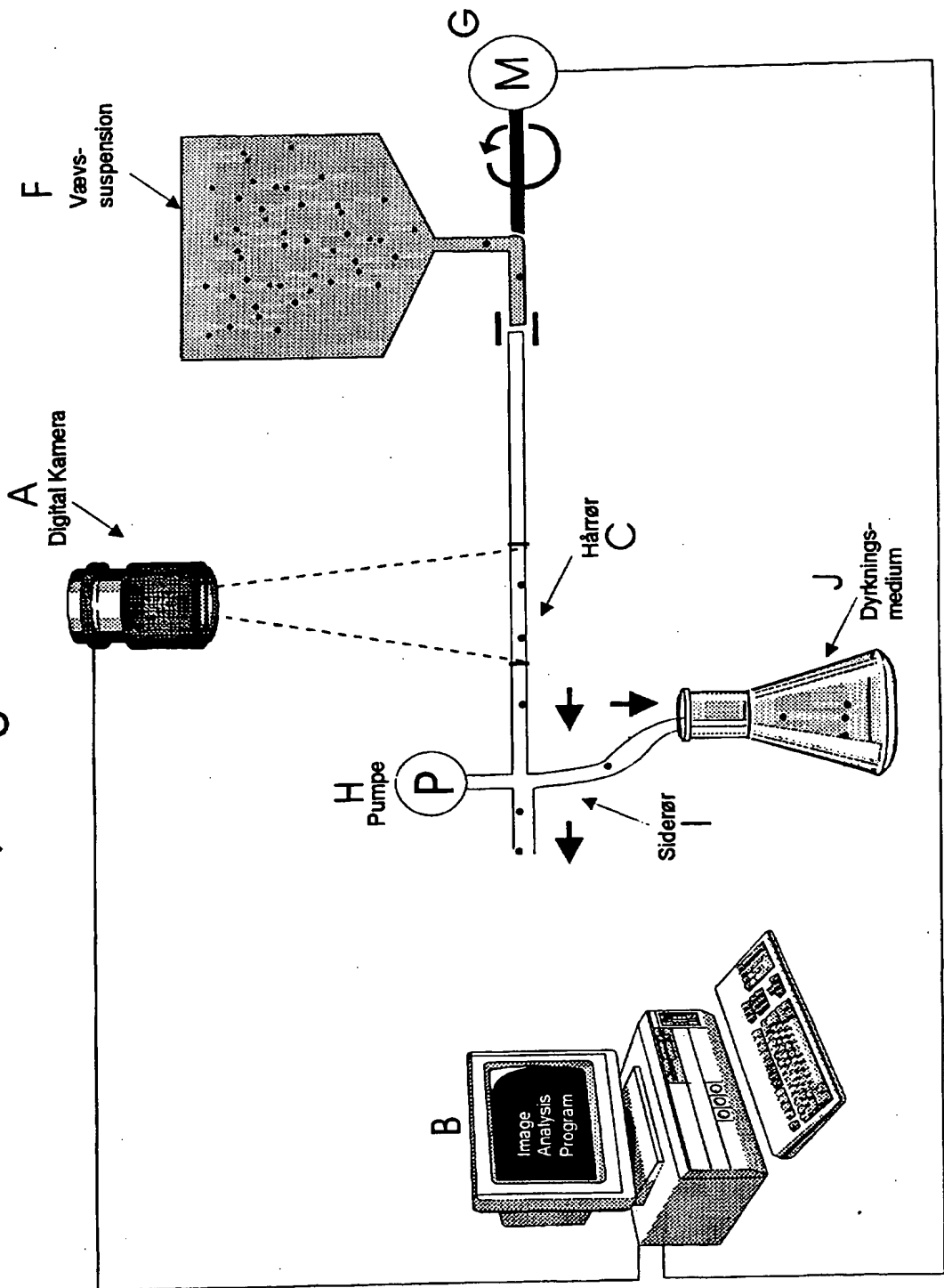
Vævssuspensionen belyses af en lyskilde (ikke vist på figur I). Se kommentar side 4 nederst.

Århus den / -1998.

Søren Gregersen.

Ø-isolations apparatur

Løsningsmodel I.



Ø-isolations apparatur

Løsningsmodel II

